

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—82090

⑤Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 昭和59年(1984)5月11日
C 12 P 7/42		6760—4 B	
17/02		7258—4 B	発明の数 17
//(C 12 P 7/42			審査請求 未請求
C 12 R 1/66 )		6760—4 B	
(C 12 P 7/42			
C 12 R 1/72 )		6760—4 B	
(C 12 P 7/42			
C 12 R 1/78 )		6760—4 B	

(全 7 頁)

## ⑭ ガンマーデカラクトンの製造方法

⑮特 願 昭58—164888

⑯出 願 昭58(1983)9月6日

優先権主張 ⑰1982年9月27日⑱世界知的所有権機関(WO)・米国(US)  
⑲PCT/JUS82/01323

⑳発 明 者 モハマド・アイ・フアード  
アメリカ合衆国08540ニュー・  
ジャージー・プリンストン・メ

ドー・レイン1エイチ

㉑出 願 人 フリツチエ・ダツジ・アンド・  
オルコット・インコーポレイテ  
イド

アメリカ合衆国10011ニュー・  
ヨーク・ニュー・ヨーク・ナイ  
ンス・アベニュー76

㉒代 理 人 弁理士 宇佐見忠男

最終頁に続く

## 明 細 書

を生成し、そして得られた $\gamma$ -デカラクトンは  
回収される。

## 1. 発明の名称

ガンマーデカラクトンの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

1. カスターオイルの存在下において、カスター  
オイルを加水分解し得る微生物を培養もしくは  
孵置すること、そして得られた加水分解物の $\beta$ -  
酸化を行ない $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を生  
成することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキン  
デカン酸の製造方法

2. 「特許請求の範囲 1.」による方法において、  
該微生物はアスペルギルスオリザエ、カンジダ  
ルゴザ、グオトリウムクレバーニー、もしくは  
ヤロウィアポリチカである。

3. 「特許請求の範囲 1.」による方法において、  
該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は原位置(インサ  
イチュー)でラクトン化され $\gamma$ -デカラクトン

4. 「特許請求の範囲 1.」による方法において、  
該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は回収され、そし  
てラクトン化されて $\gamma$ -デカラクトンを生成す  
る。

5. 「特許請求の範囲 1.」による方法において、  
該微生物の培養もしくは孵置の間にコオキサン  
ドが添加されもしくは存在せられる。

6. カスターオイル加水分解物の存在下において、  
カスターオイル加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない  
得る微生物を培養もしくは孵置して $\gamma$ -ハイド  
ロキシデカン酸を生成することからなる光学活  
性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の製造方法

7. 「特許請求の範囲 6.」による方法において、  
該微生物はハンセヌラサチュルヌス、カンジダ

ギリエルモンディ、カンジダアルビカンス、カンジダクルセイ、カンジダバラクルセイ、カンジダブシュードトロピカリス、カンジダステラトイデア、カンジダトロピカリス、アスペルギルスオリザエ、カンジダルゴザ、グオトリクムクレバーニ、もしくはヤロウィアトリポリチカである。

8. 「特許請求の範囲 6.」による方法において、該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は原位置（インサイチュー）でラクトン化され $\gamma$ -デカラクトンを生成し、そして得られた $\gamma$ -デカラクトンは回収される。

9. 「特許請求の範囲 6.」による方法において、該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は回収され、そしてラクトン化されて $\gamma$ -デカラクトンを生成する。

10. 「特許請求の範囲 6.」による方法において、

(3)

13. 「特許請求の範囲 11.」による方法において、該リパーゼ酵素は微生物、豚臓、菌類、もしくはイーストに起因するものである。

14. 「特許請求の範囲 11.」による方法において、該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は原位置（インサイチュー）でラクトン化され $\gamma$ -デカラクトンを生成し、そして得られた $\gamma$ -デカラクトンは回収される。

15. 「特許請求の範囲 11.」による方法において、該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は回収され、そしてラクトン化されて $\gamma$ -デカラクトンを生成する。

16. 「特許請求の範囲 11.」による方法において、該微生物の培養もしくは貯蔵の間にコオキナントが添加されもしくは存在せられる。

17. カスターオイルとコオキナントの存在下に

(5)

該微生物の培養もしくは貯蔵の間にコオキナントが添加されもしくは存在せられる。

11. リパーゼを用いてカスターオイルを酵素的に加水分解して酵素的加水分解物を生成すること、そして該加水分解物の存在下において該酵素的加水分解物の $\mu$ -酸化を行ない得る微生物を培養もしくは貯蔵して $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を生成することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の製造方法

12. 「特許請求の範囲 11.」による方法において、該微生物はハンセンラサチュルヌス、カンジダギリエルモンディ、カンジダアルビカンス、カンジダクルセイ、カンジダバラクルセイ、カンジダブシュードトロピカリス、カンジダステラトイデア、カンジダトロピカリス、アスペルギルスオリザエ、カンジダルゴザ、グオトリクムクレバーニ、もしくはヤロウィアトリポリチカである。

(4)

においてヤロウィアトリポリチカを発酵して $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を生成すること、そして該発酵培地の pH を調節して原位置（インサイチュー）において $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸をラクトン化して $\gamma$ -デカラクトンを形成すること、そして該 $\gamma$ -デカラクトンを回収することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の生成方法

#### 8. 発明の詳細な説明

本発明は光学活性 $\gamma$ -デカラクトンの製造のための微生物学的方法に関するものである。光学活性ラクトンの製造に対するより良い方法に対する検討において可成りの時間と努力とが微生物学者によって費やされて来た。米特許第 3, 076, 750 号はケトカルボン酸の微生物学的還元によるある種の光学活性ラクトンとそれらに相当するハイドロキシカルボン酸の製造方法を開示した。ある種のカンジダ種によるリシノレイン酸の代謝はオクイ等によって研究され、彼等は $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸はリシノレイン酸の酸化崩壊における中

(6)

間体であることを示した (J. Biochemistry, 54, 536~540, 1963)。しかしながら使用され得る基質の量を制限する発酵の完了時における $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の代謝およびシノレイン酸の微生物に対する毒性のために、発酵培地からはほんの痕跡程度の量の $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸しか回収されなかった。

カスターオイルの存在下において本発明はカスターオイルを加水分解し得る微生物を培養もしくは貯置すること、そして得られた加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を生成することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の製造方法を提供するものである。

他の実施態様においては、本発明はリパーゼを用いてカスターオイルを酵素的に加水分解して酵素的加水分解物を生成すること、そして該加水分解物の存在下において酵素的加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない得る微生物を培養もしくは貯置して $\gamma$

(7)

養もしくは貯置すること、そして得られた加水分解物の $\beta$ -酸化を行なうこと、もしくはカスターオイルの加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない得る微生物、もしくはカスターオイルの酵素的加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない得る微生物を培養もしくは貯置することを包含する。基質としてのカスターオイルもしくはカスターオイル加水分解物は工程中に用いられる微生物によって決定せられる。工程における収量を向上せしめるためにコオキシダントが培地に添加される。

該工程のために適した微生物の選択は適用される本発明の実施態様、要求される製品の収量、そして該カスターオイル加水分解物に見出される脂肪酸の毒性に対する抵抗性によって大きく左右される。本発明における微生物はバクテリア、イースト、もしくは線状菌類である。該カスターオイル基質の加水分解および得られた加水分解物の $\beta$ -酸化のために用いられる微生物として望ましいものは、アスペルギルスオリザエ、カンジダ

(9)

-ハイドロキシデカン酸を生成することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を製造する方法を提供する。

更に他の実施態様においては、本発明はカスターオイルの存在下においてカスターオイルを加水分解し得る微生物およびカスターオイル加水分解物の $\beta$ -酸化を行ない得る微生物を培養もしくは貯置して $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を製造することからなる光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸を製造する方法を提供する。

以下に本発明を詳細に説明する。

上記したように本発明はラクトン化によって任意に $\gamma$ -デカラクトンに変換し得る光学活性 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸の製造のための発酵工程を提供する。適用される本発明の実施態様によれば、該発酵工程はカスターオイルもしくはカスターオイル加水分解物基質の存在下において適当な培地で、カスターオイルを加水分解し得る微生物を培

(8)

ゴザ、グオトリクムクレバーニーもしくはヤロウィアトリポリチカ、(以前はサッカロミコブシスリポリチカとして知られ、最近まではカンジダトリポリチカとして知られていた)、特に望ましいものはヤロウィアトリポリチカである。カスターオイル加水分解物の $\beta$ -酸のみに用いられる微生物として望ましいものはハンセメラサチュルヌス、カンジダギリエルモンディ、カンジダアルピカンス、カンジダクルセイ、カンジダバラクルセイ、カンジダブシュードトロビカリス、カンジダステラトイデア、カンジダトロビカリス、アスペルギルスオリザエ、カンジダルゴザ、グオトリクムクレバーニー、もしくはヤロウィアトリポリチカ、特に望ましいものはカンジダギリエルモンディである。リパーゼとカスターオイルとの結合において用いられる微生物として望ましいものはハンセメラサチュルヌス、カンジダギリエルモンディ、カンジダアルピカンス、カンジダクルセイ、カンジダバラクルセイ、カンジダブシュードトロビカリス、カンジダステラトイデア、カンジダトロビカリス、

00

アスベルギルスオリザエ、カンジダルゴザ、ゲオトリクムクレバーニー、もしくはヤロウィアリボリチカ、特に望ましいものはカンジダギリエルモンディである。一般的にいかなるタイプのリパーゼ酵素も微生物、酵母、菌類、もしくはイーストに起因するものを含めてカスターオイルを加水分解するために用いられる。

本発明の工程における微生物と共に用いられるリパーゼにおいて、該酵素的加水分解物の形成は該工程において用いられるリパーゼの量を限定することによって調節せられる。これは加水分解物の過剰量の存在に起因する毒性を回避するであろう。要求されるリパーゼの適当な量は好都合なことに実験によって見出され、そしてリパーゼと用いられる微生物と培地状態に左右されるであろう。リパーゼを用いる加水分解は同一の反応容器において発酵と同時に進行することが最も望ましい。しかしながら該加水分解はもし適当な分量が該加水分解物の毒性効果を回避するためにとられるな

(11)

のである。適当な炭素源としては例えばグルコース、ガラクトース、L-ソルボース、マルトース、シュクロース、セロビオース、トレハロース、L-アラビノース、L-ラムノース、エタノール、グリセロール、L-エリスリトール、D-マンニトール、ラクトース、メリビオース、ラフィノース、メレリトース、デンプン、D-キシロース、D-ソルビトール、 $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、乳酸、クエン酸、およびコハク酸がある。適当な窒素源としては例えばペプトン、肉抽出物、イースト抽出物、コーン浸漬液、そしてカゼイン、尿素、アミノ酸、もしくは例えば硝酸塩、ニトリル、および無機アンモニウム塩のような無機化合物を含む窒素がある。適当な無機塩としては例えば磷酸塩、マグネシウム、カリウム、カルシウム、ナトリウムがある。該培地媒体中の上記栄養素は所望なれば例えばビタミンBグループの一種もしくは二種以上、および/または例えばFe、Mo、Cu、Mn、Bのような一種もしくは二種以上の痕跡ミネラルによって補強される。しかしながら

(13)

らは発酵に先立って行われることも出来よう。カスターオイルが本発明において用いられる時、毒性に対する心配はトリグリセライドが生物に対して非毒性であるために解消せられる。加うるに基質としてのカスターオイルおよびカスターオイル加水分解物の使用はカスターオイルの加水分解にもとづく他の脂肪酸の存在のために効率が向上した工程に対してコオキシダントを提供する。

微生物が用いられる形態は重要なものではない。それらは例えば細胞とそれに調和する栄養液とを含む培地（懸濁液）として、もしくはバッファー溶液中に懸濁された細胞の形状で用いられ得る。それらの細胞もしくは酵素抽出物はその後転移を行なうために用いられる適当な固体支持体に固定される。

培地懸濁液は適当な媒体に微生物を接種することによって調製される。適当な媒体とは炭素源、窒素源、無機塩、および成長因子を含んでいるも

(12)

該工程は例えばイースト抽出物の少量が媒体に添加せられる場合にはビタミンもしくは痕跡ミネラルは必要でない場合があるようにビタミンを含まない媒体においても遂行せられる。

微生物の培養は望ましくは好気条件下において固定培地もしくは液中培地（例えば振盪培地、発酵槽）として行われる。pH領域は約3.5から約8.0そして望ましくは約4.0から約7.5の範囲が適当である。該pHは例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムのような無機もしくは有機塩基の添加によって、イオン交換樹脂によって、もしくは磷酸塩もしくはフタル酸塩のようなバッファーの添加によって調節せられる。孵育温度は約15℃から33℃の間、望ましくは約20℃から30℃の範囲で維持されることが適当である。

本発明による方法は基質としてのカスターオイルもしくはカスターオイル加水分解物を培養の始

(14)

まりに唯一の炭素源として培地媒体に添加することによって好都合に行われる。それに代えて基質には例えばデキストロースのような他の炭素源を組合せて培養の間もしくは培養が完了した時に添加してもよい。媒体中の基質の量、水準、もしくは濃度は種々に設定される。例えば、加水分解されたカスターオイルの場合には約0.3%から約5%の水準の媒体が最初形成されるかもしくは発酵の過程の間に添加されるが、一方では実質的に如何なる水準のカスターオイルでも用いられる。

反応時間は培地媒体の組成および基質濃度によって種々に変化する。一般的には振盪フラスコ培地では微生物と培地媒体の組成によって約2時間から約240時間を要する。しかしながら発酵槽が用いられる場合には発酵時間は約100時間もしくはそれ以下に短縮されるであろう。

該発酵は培養液から単離された微生物の細胞を用いるかまたは本質的に知られている手段で細胞

03

くは大豆油のような通常の消泡剤は泡出ちを調節するために用いられることが出来る。

基質の転移は例えばGLC, TLC, HPLC, IR, およびNMRのような標準的な分析手法を用いて監視することが出来る。もし基質の急速な消滅が観察されたならば、微生物の転移能力を最大にするために更に基質が添加される。該培養は一般的に基質のすべてが培地媒体から消滅した時に終了する。

発酵工程が完了した後、 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は媒体中でラクトン化されるかもしくは単離してから溶媒抽出および蒸留を含む通常の手法によって精製せられる。原位置(インサイチュ)ラクトン化が望まれる時は、媒体のpHは例えば塩酸のような適当な酸の添加によって約1から約5、望ましくは約1から約3の間に調節せられ、そして得られた混合物は約50℃から約100℃、望ましくは約70℃から約100℃で約10分間

07

から単離された酵素抽出物によって行われるであろう。この場合、該発酵は例えばバッファー溶液、生理的食塩水、新鮮な栄養液、もしくは水のような水性溶液の中において好都合に行われることが出来る。単離された細胞もしくは酵素抽出物は固体支持体上に固定されそして所望の転移が生きている微生物の無存在下に行われる。該基質の転移は微生物の突然変異体によって行われる。かような突然変異体は例えば細胞をUVもしくはX線、もしくは例えばアクリジンオレンジのような通常の突然変異誘発要因物質に曝露することのようなこの技術分野においてはよく知られている方法によって容易に得られることが出来る。

一般的には基質が媒体に直接添加される。例えば Tween 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート) のような界面活性剤もしくは分散剤がまた基質の水性懸濁液に添加される。例えばシリコンオイル(例えばUCON)、ポリアルキレングリコール誘導体、トウモロコシ油、もし

04

加熱せられ、上記加熱によって $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸は $\gamma$ -デカラクトンに変換する。該 $\gamma$ -デカラクトンはその後回収され通常の手法によって精製される。もし該 $\gamma$ -ハイドロキシデカン酸が回収されたならば、既知の方法によってラクトン化されるであろう(例えばI. L. Finar, Organic Chemistry, 6th ed., Vol. 1 p 469(1973)参照)。

下記の実施例は実施に際して望ましい本発明の実施態様を説明するために役立つものであるが、本発明の範囲を限定することを意味するものではない。特に記述されない限り、重量はグラム、温度は摂氏、圧力はmm Hgである。

#### 実施例1

2%牛肉抽出物の100 mlと0.02% Tween 80を含むフラスコは120℃20分間のオートクレーブ処理された。該媒体にはその後媒体の1 mlあたり $10^7$ 細胞数のヤロウィアポリチカ(サ

08

ッカロミコブシスリポリチカ)が接種されそして10gのカスターオイルが添加された。該培地はロータリーシェイカー(200rpm)上で26℃、1週間静置された。該媒体のpHは時々6.5~7.0に調節された。該発酵期間の終りに該媒体のpHは氫酸の添加によって1.5に調節されそして該混合物は100℃で10分間加熱せられた。冷却後、有機生成物はヘキサンで抽出せられ、そしてヘキサンは蒸発せられ、そして残渣は蒸留せられてGLC純度90%の $\gamma$ -デカラクトンが0.61g得られた。

## 実施例2

0.05gのデカン酸が日毎添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とが用いられた。GLC純度92%の $\gamma$ -デカラクトンが0.69g得られた。

## 実施例3

カンジダキリエルモンディが用いられそして3

09

微生物としてアスペルギラスオリザエが用いられそして3gのカスターオイルが添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とを用いることによって所望の生成物 $\gamma$ -デカラクトン(0.86g/L)が得られた。

## 実施例7

微生物としてグオトリクムクレバーニーが用いられそして3gのカスターオイルが添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とを用いることによって所望の生成物 $\gamma$ -デカラクトン(0.2g/L)が得られた。

## 実施例8

微生物としてカンジダキリエルモンディが用いられそして媒体の各100mlに対して100mgのリパーゼ(ステアブシン、Nutritional Biochem Corp.)が添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とを用いることによって所望の生成物 $\gamma$ -デカラクトンが

20

gのカスターオイル加水分解物が添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とが用いられた。34%収率で所望の生成物 $\gamma$ -デカラクトンが得られた。

## 実施例4

カスターオイルと共にリパーゼが添加されること以外は実施例1に記載されたと同様な方法と材料とを用いることによって所望の生成物 $\gamma$ -デカラクトンが得られた。

## 実施例5

例えばC.アルビカンズ、C.クルセイ、C.バラクルセイ、C.ブシュードトロピカリス、C.ステラトイデア、C.トロピカリス等のカンジダ属の他のものが用いられること以外は実施例1、2、3に記載されたと同様な方法と材料とを用いることによって所望の $\gamma$ -デカラクトンが得られた。

## 実施例6

21

得られた。

本発明は上記の如く説明されているけれども、同様なことが様々な方法で変換され得ることは明白であろう。かような改変は本発明の精神および範囲から逸脱するものと解釈されてはならないし又これらすべての変更は前述の特許請求の範囲に含まれるものである。

特許出願人 フリッチェ ダッジ アンド  
オルコット インコーポレイテッド

代理人 宇佐見 忠 男



22

第1頁の続き

⑦発明者   ブライアン・ジェイ・ウィリス  
              アメリカ合衆国07446ニュー・  
              ジャージー・ラムゼイ・グース  
              ・コーブ・レイン5